

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 608 703 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **94100332.9**

(51) Int. Cl.⁵: **B01J 20/32, B01D 15/08**

(22) Anmeldetag: **12.01.94**

(30) Priorität: **23.01.93 DE 9300912 U**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.08.94 Patentblatt 94/31

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE DE FR GB LU NL

(71) Anmelder: **MACHEREY, NAGEL & CO.**
Neumann-Neander-Str. 6-8
D-52355 Düren(DE)

(72) Erfinder: **Riering, Helmut, Dr.**
Echternacher Strasse 8
D-50933 Köln(DE)
Erfinder: **Sieber, Manfred, Dr.**
Harscheidter Strasse 40
D-52385 Nideggen(DE)

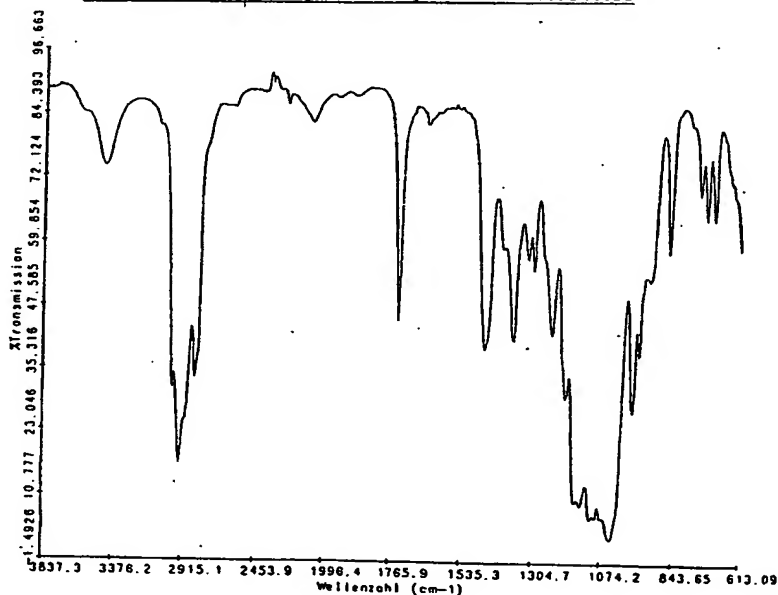
(74) Vertreter: **Paul, Dieter-Alfred, Dipl.-Ing.**
Fichtestrasse 18
D-41464 Neuss (DE)

(54) Trennmateriel für die Chromatographie.

(57) Ein Trennmateriel für die Chromatographie enthält ein Cyclodextrin oder ein Cyclodextrinderivat und einen Träger, welche chemisch über eine Zwischengruppe verbunden sind. Erfindungsgemäß enthält die Zwischengruppe eine Thioetherbrücke.

FIG. 1

IR-Spektrum des methylierten Cyclodextrinselektors



EP 0 608 703 A1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Trennmateriel für die Chromatographie, enthaltend ein Cyclodextrin oder ein Cyclodextrinderivat und einen Träger, welche chemisch über eine Zwischengruppe verbunden sind.

Solche Trägermaterialien sind bekannt. So offenbart beispielsweise die US-A-4,539,399 ein Trägermaterial, in dem Cyclodextrin mit Kieselgel über einen Silanether verbunden ist. Weitere ähnliche Trennmaterielien sind beispielsweise in der DE-A-40 06 923, in J. Chromatogr., 350 (1985), S. 371 bis S. 380, Anal. Chem. 55 (1983) S. 1852 bis 1857 und 62 (1990) S. 2198 bis 2205 beschrieben.

Bei all diesen Trennmaterielien erfolgt die Anbindung des Cyclodextrins entweder durch direkte Reaktion der Hydroxylgruppen mit reaktiven Endgruppen modifizierter Kieselgele oder nach Aktivierung eines Teils der Hydroxylgruppen durch Umsetzung mit modifiziertem Kieselgel.

Die Trenneigenschaften solcher Trennmaterielien können durch Substitution der Hydroxylgruppen der Cyclodextrine verändert werden. Dies führt jedoch bei den obigen Produkten häufig zu Schwierigkeiten. So muß bei einer Derivatisierung nach Anbindung an den Träger dessen Stabilität im sauren und basischen Bereich berücksichtigt werden. Reinigungsschritte, die durch Nebenprodukte oder unvollständige Umsetzungen erforderlich wären, können häufig nicht durchgeführt werden. Die zur Derivatisierung verwendeten Reagentien können auch mit den Endgruppen des Trägers, beispielsweise des modifizierten Kieselgels, reagieren und unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Analyt und Phase hervorrufen. Die Derivatisierung nach einem Aktivierungsschritt der Hydroxylgruppen kann auch durch die Reaktivität der Aktivierungsgruppen, beispielsweise Tosylgruppen, Carbamidsäureester und Aminofunktionen, eingeschränkt werden. Werden die Cyclodextrine vor der Anbindung derivatisiert, so müssen Hydroxylgruppen für die Anbindung freibleiben. Diese Art der Reaktionsführung erlaubt es nicht, die Hydroxylgruppen quantitativ zu derivatisieren.

Wegen der genannten Schwierigkeiten besteht ein weiterer Bedarf an der Schaffung von Trennmaterielien für die Chromatographie durch Anbindung von Cyclodextrinen an Trägermaterialien wie beispielsweise Kieselgel.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist somit die Schaffung weiterer Trennmaterielien für die Chromatographie, die ein Cyclodextrinderivat und einen Träger enthalten, welche chemisch über eine Zwischengruppe verbunden sind.

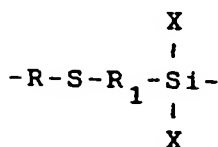
Gelöst wird diese Aufgabe dadurch, daß die zur Anbindung verwendete Zwischengruppe eine Thioetherbrücke enthält.

Als Cyclodextrinderivate können α -, β - oder γ -Cyclodextrine oder deren Alkylierungsprodukte, insbesondere quantitativ bzw. nahezu quantitativ alkylierte, eingesetzt werden. Die Cyclodextrine werden mit einem sogenannten Spacer umgesetzt. Als Spacer dienen dabei Verbindungen, die eine Doppelbindung in das Molekül einführen. Geeignete Verbindungen enthalten eine Doppelbindung und eine reaktive Gruppe zur Anbindung des Spacers an das Cyclodextrin. Beispiele für geeignete reaktive Gruppen sind ungesättigte Carbonsäurechloride, Carbonsäureanhydride, Tosylate, Isocyanate und Halogenide. Bevorzugt sind Alkenylhalogenide mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt ist Allylbromid.

Als Alkylierungsprodukte der Cyclodextrine sind solche bevorzugt, die durch Alkylierung nach Einführung des Spacers erhalten werden. Die eingeführten Alkylgruppen haben bevorzugt 1 bis 10 Kohlenstoffatome, insbesondere 1 bis 5 Kohlenstoffatome. Bevorzugt werden dabei Cyclodextrine eingesetzt, in denen alle OH-Gruppen quantitativ bzw. nahezu quantitativ derivatisiert sind.

Als Träger können sowohl anorganische als auch organische, dem Fachmann bekannte Materialien für die Chromatographie verwendet werden, soweit sich ihre Oberflächen mit Thiolgruppen versehen lassen. Dabei wird Kieselgel bevorzugt; es können aber auch Materialien wie Aluminiumoxid, Titandioxid oder Partikel auf Basis von Vinyl- oder Methacrylamidpolymeren verwendet werden.

Als Zwischengruppe zwischen dem Cyclodextrin und dem Trägermaterial Kieselgel fungieren mit einem Spacer umgesetzte Gruppierungen mit einer Thioetherfunktion. Bevorzugt ist ein Rest der folgenden Formel:



Darin haben R und X die folgende Bedeutung:

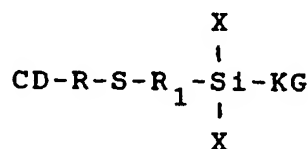
R Alkyl- oder Aralkylspacer mit 1-20 C-Atomen, bevorzugt mit 1 bis 6 C-Atomen;

X Alkoxy-, Aralkoxy- oder Alkylgruppe mit 1 bis 20 C-Atomen bevorzugt mit 1 bis 3 C-Atomen, wobei mindestens ein X Alkoxy oder Aralkoxy;

5 R₁ Alkoxy-, Aralkoxy- oder Alkylrest mit 1 bis 20 C-Atomen, bevorzugt 3 bis 6 C-Atomen.

Nach Einführung der Zwischengruppe sind die Kieselgelmatrix KG und der Cyclodextrinrest CD auf folgende Weise miteinander verbunden:

10

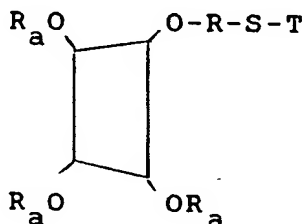


15

Dabei haben KG, CD, R, R₁ und X die oben angegebenen Bedeutungen.

Die erfindungsgemäßen Trennmateriale weisen insbesondere die folgende allgemeine Formel auf:

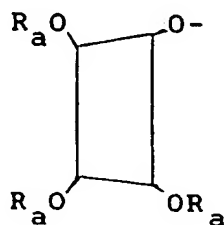
20



25

30 worin bedeuten:

35



40

einen α-, β- oder γ-Cyclodextrinrest oder dessen alkyliertes Derivat,

T einen Träger, wie beispielsweise anorganisches Material oder synthetischer organische Polymerträger,

45 R einen Alkyl- oder Aralkylspacer mit 3-20 C-Atomen, bevorzugt mit 3 bis 6 C-Atomen,

R_a ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 10 C-Atomen, bevorzugt 1 bis 5 C-Atomen.

Als Träger sind folgende Materialien bevorzugt: anorganische Materialien, wie z.B. Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid u.ä. oder synthetische organische Polymerträger, wie z.B. Polystyrol, Polyacrylamid u.ä.

50 Zur Belegung des Trägers mit Thiolgruppen ist in Abhängigkeit vom Trägergrundmaterial jede dem Fachmann bekannte Reaktionsfolge geeignet, die an dem Träger gebundene Thiolgruppen erzeugt. Als Beispiele seien genannt:

- Reduktion von Sulfonsäuregruppen,
- nucleophile Substitutionen mit Natriumhydrogensulfid und
- 55 - reduktive Spaltung von Disulfiden.

Die Belegung des Trägers Kieselgel erfolgt bevorzugt durch Umsetzung mit einem thiolgruppenhaltigen Silan. Als solches Reagens können beispielsweise Silane der Formel

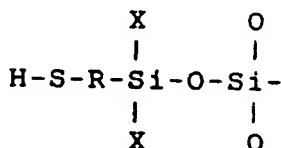
HS-R-SiX₃

worin bedeuten:

R einen Alkyl- oder Aralkylrest mit 1-20 Atomen, bevorzugt mit 1 bis 6 C-Atomen, und

X eine Alkoxy-, Aralkoxy- oder Alkylgruppe mit 1-20 C-Atomen, bevorzugt mit 1 bis 3 Atomen, wobei mindestens ein X Alkoxy oder Aralkoxy ist,

verwendet werden, insbesondere 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan, 3-Mercaptopropyltriethoxysilan, Mercaptoethyltrimethylethoxysilan oder (Mercaptoethyl)methyldiethoxysilan. Das Kieselgel erhält dadurch an seiner Oberfläche Gruppierungen der allgemeinen Formel:



Überschüssige Silanolgruppen können, falls erforderlich, nach den in der Literatur zahlreich bekannten Methoden nachsilanisiert (endgecappt) werden.

Die erfindungsgemäßen Trennmateriale lassen sich wie folgt herstellen. Das Cyclodextrin wird mit einem Reagens umgesetzt, das eine Kohlenstoffdoppelbindung in das Molekül einführt. Dazu werden beispielsweise Alkenylhalogenide oder Alkenyltosylate verwendet, die 3 bis 20 Kohlenstoffatome, bevorzugt 3 bis 6 C-Atome, enthalten können. Solche Stoffe sind beispielsweise: Allylbromid oder 4-Brom-1-buten oder 6-Brom-1-hexen. Besonders geeignet ist Allylbromid.

Nach Einführung der Doppelbindung kann die erhaltene Cyclodextrinverbindung auf üblichen Weise alkyliert werden, beispielsweise durch Einführung von Alkylgruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, bevorzugt mit 1 bis 5 C-Atomen.

Die beiden Reaktionsprodukte, das Cyclodextrin bzw. Cyclodextrinderivat und der mit Thiolgruppen belegte Träger werden dann in Gegenwart eines Radikalkettenstarters, beispielsweise Azoisobutyronitril, miteinander umgesetzt, wobei sich durch Reaktion der Doppelbindung des Cyclodextrins mit der Thiolgruppe am Träger eine Thioetherbrücke ausbildet.

Die erfindungsgemäßen Trennmateriale eignen sich insbesondere für die Trennung von Racematen, beispielsweise von Thalidomid, Mandelsäure, Hexobarbital, Phenobarbital und Chlorthalidon. Die überraschende Leistungsfähigkeit des Trennmateriale mit dem methylierten Selektor zeigt sich z.B. in der wesentlich verbesserten und schnelleren Auftrennung der Barbiturate Mephobarbital und Hexobarbital im Vergleich zur konventionellen Cyclodextrinphase mit undertivatisierten Hydroxylgruppen. Die Trennmateriale sind in allen Chromatographieverfahren einsetzbar, insbesondere in der Flüssigkeitschromatographie (LC), Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Einführung von Thiolgruppen in Kieselgel

100 g Kieselgel (z.B. NUCLEOSIL 100-5 der Fa. Macherey, Nagel, Düren) wurden über Nacht bei 180 °C getrocknet und in 400 ml wasserfreiem Toluol aufgeschlämmt. Man setzte 2 ml Butylamin und 30 ml 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan zu und erhitze 4 Stunden unter Rückfluß. Die Suspension wurde über eine Glasfritte abfiltriert und mit Methylenchlorid, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen.

Die C, H, S-Bestimmung des so erhaltenen Kieselgels lieferte folgende Ergebnisse:

4.36 % C, 1.15 % H und 2.56 % S.

Aus dem Schwefelgehalt ergibt sich eine Belegung von 0.8 mmol Schwefel pro Gramm Kieselgel.

Beispiel 2: Einführung eines Spacers in Cyclodextrin

10 g β-Cyclodextrin wurden über Nacht bei 110 °C getrocknet und in 100 ml Dimethylformamid suspendiert. Man setzte 0,8 g Natriumhydrid-Dispersion (60-65 % Natriumhydrid) zu und rührte 1 Stunde. Es bildete sich ein Gel. Zu der Reaktionsmischung fügte man 3,6 g Allylbromid und ließ über Nacht rühren. Zur Aufarbeitung wurde die klare Lösung in 500 ml Methylenchlorid eingerührt. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abgesaugt und mit Methylenchlorid gewaschen. Das Rohprodukt wurde bei 40 °C getrocknet und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Beispiel 3: Herstellung des Trennmateri als

4 g der unter Beispiel 2 hergestellten Verbindung und 10 g des unter Beispiel 1 hergestellten Kieselgels wurden in 100 ml Methanol und 20 ml Wasser suspendiert. Man fügte 100 mg Azoisobutyronitril zu und spülte die Apparatur mit Stickstoff. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde die Suspension über eine Glasfritte abfiltriert und das Kieselgel mit Methanol, Wasser, Methanol und Methylenchlorid gründlich gewaschen. Staubanteile wurden durch Sedimentation entfernt.

10 Beispiel 4: Herstellung des methylierten Selektors

5 g Natriumhydrid-Dispersion (60-65 % Natriumhydrid) wurden in 50 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und bei 50 °C 1 Stunde gerührt. Anschließend fügte man 2,5 g des Produktes aus Beispiel 2 zu und rührt bei Raumtemperatur 1 Stunde.

15 Man ließ 10 ml Methyljodid in 20 ml Dimethylsulfoxid langsam zutropfen. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt.

Zur Aufbereitung wurde die klare Lösung in 600 ml Wasser eingerührt. Die wäßrige Phase wurde viermal mit 50 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten, mit Natriumsulfat getrockneten organischen Phasen reinigte man durch Säulenfiltration (POLGOSIL 63100, Toluol/Ethanol 4:1). Nach dem Einengen im Vakuum blieb ein Öl zurück.

20 Zur Charakterisierung des permethylierten Selektors wurden ein ¹H-NMR- und ein IR-Spektrum erstellt. Es lassen sich damit folgende Aussagen treffen:

¹H-NMR-Spektrum:

- 25
- Nachweis der olefinischen Protonen (5.15 und 6 ppm)
 - Nachweis von 3 unterschiedlichen Methoxyprotonen (O-CH₃; 2,3 und 6-Stellung) bei 3.4, 3.5 und 3.7 ppm als Singulets.
 - Die Intensität der Signale der Methoxyprotonen sind vergleichbar, jedoch ist eine Quantifizierung durch Integration durch die Signalüberlagerung mit den Protonen des Cyclodextrins nicht möglich.
- 30

IR-Spektrum:

Dieses Spektrum zeigt starke Signale im Bereich um 2900 cm⁻¹ (CH-Valenzschwingung) und zwischen 1050 und 1240 cm⁻¹ (C-O-C-Valenzschwingungen). Die Absorption im Bereich der OH-Gruppen (3400 cm⁻¹) ist dagegen extrem schwach ausgeprägt. Sie kann auch durch Wasserspuren hervorgerufen worden sein. Dieses deutet auf eine quantitative bzw. nahezu quantitative Derivatisierung der Hydroxylgruppen hin. Das IR-Spektrum ist in der Figur 1 dargestellt.

40 Beispiel 5: Herstellung eines Trennmateri als mit methyliertem Selektor

Das unter Beispiel 4 erhaltene Öl und 5 g des unter Beispiel 1 hergestellten Kieselgels wurden in 100 ml Methanol suspendiert. Man fügte 50 mg Azoisobutyronitril zu und spülte die Apparatur mit Stickstoff. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde die Suspension über eine Glasfritte abfiltriert und das Kieselgel mit Methanol, Wasser, Methanol und Methylenchlorid gründlich gewaschen. Staubanteile wurden durch Sedimentation entfernt.

Beispiel 6: Trennung von Substanzen

50 Das nach Beispiel 3 erhaltene Material wurde in eine HPLC-Säule mit der Länge 200 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm und das nach Beispiel 5 erhaltene Material in eine HPLC-Säule der Länge 150 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm gefüllt und zur Trennung von Racematen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

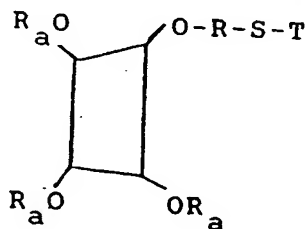
Substanz	Laufmittel	Phase ^{a)}	Fluß [ml/min]	RT ²⁾ [min]
Hexobarbital	Methanol/50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.0, 45/55	1	0.7	23.8/26.3
Hexobarbital	Methanol/Wasser 50/50	2	0.7	5.0/6.2
Mephobarbital	Methanol/50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.0, 40/60	1	0.6	26.1/28.3
Mephobarbital	Methanol/Wasser 50/50	2	0.7	6.6/9.1
Chlorthalidon	Methanol/Wasser 40/60	1	0.7	12.2/15.8
Thalidomid	Methanol/50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.5, 40/60	1	0.7	9.8/10.5
Ibuprofen	Methanol/0.1 % TEAA pH 4.0, 50/50	2	0.7	30.3/33.3
Ciprofibrat	Methanol/0.1 % TEAA pH 4.0, 50/50	2	0.7	7.0/8.3
Mandelsäure	Methanol/50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 3.0, 95/5	1	0.7	25.5/27.3

^{a)} 1: Phase nach Beispiel 3; 2: Phase nach Beispiel 5

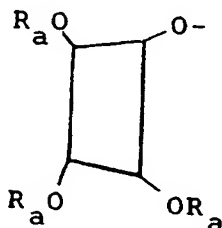
²⁾ Retention Time

Patentansprüche

1. Trennmateriale für die Chromatographie, enthaltend ein Cyclodextrin oder ein Cyclodextrinderivat und einen Träger, welche chemisch über eine Zwischengruppe verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischengruppe eine Thioetherbrücke enthält.
2. Trennmateriale nach Anspruch (1), gekennzeichnet durch die allgemeine Formel



worin bedeuten:



einen α -, β - oder γ -Cyclodextrinrest, oder dessen alkyliertes Derivat,

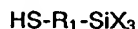
T einen Träger, wie anorganisches Material oder synthetische organische Polymerträger,

R einen Alkyl- oder Aralkylspacer mit 3-20 C-Atomen, bevorzugt mit 3 bis 6 C-Atomen

R_a ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 10 C-Atomen, bevorzugt 1 bis 5 C-Atomen.

3. Trennmateriel nach Anspruch (2),
dadurch gekennzeichnet, daß -S-T der Rest eines anorganischen Materials (Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid u.ä.) oder eines synthetischen organischen Polymerträgers (Polystyrol, Polyacrylamid u.ä.) ist, dessen Oberfläche mit Thiolgruppen belegt ist.

4. Trennmateriel nach Anspruch (3),
dadurch gekennzeichnet, daß -S-T ein Kieselgelrest ist, der durch Reaktion mit einem Silan der Struktur



mit

R₁ Alkyl- oder Aralkylrest mit 1-20 C-Atomen und

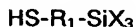
X Alkoxy-, Aralkoxy- oder Alkylgruppe mit 1-20 C-Atomen, wobei mindestens ein X Alkoxy oder Aralkoxy ist,

mit Thiolgruppen belegt wurde.

5. Verfahren zur Herstellung des Trennmateriels nach einem der Ansprüche (1) bis (4),
dadurch gekennzeichnet, daß das Cyclodextrin mit einem Reagenz umgesetzt wird, das eine Doppelbindung in das Molekül einführt, der Träger mit Thiolgruppen versehen wird und das Cyclodextrinderivat und der mercaptogruppenhaltige Träger in Gegenwart eines Radialkettenstarters miteinander umgesetzt werden.

6. Verfahren nach Anspruch (5),
dadurch gekennzeichnet, daß das Cyclodextrin mit Alkenyltosylaten oder Alkenylhalogeniden, insbesondere Allylbromid, umgesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch (5),
dadurch gekennzeichnet, daß das Kieselgel mit einem Silan der Struktur



mit

R₁ Alkyl- oder Aralkylrest mit 1-20 C-Atomen

X Alkoxy-, Aralkoxy- oder Alkylgruppe mit 1-20 C-Atomen, wobei mindestens ein X Alkoxy oder Aralkoxy ist,

umgesetzt wird.

8. Verwendung der Trennmaterien nach den Ansprüchen (1) bis (4) zur Trennung von organischen Verbindungen, insbesondere von Racematen.

IR-Spektrum des methylierten Cyclodextrinselektors

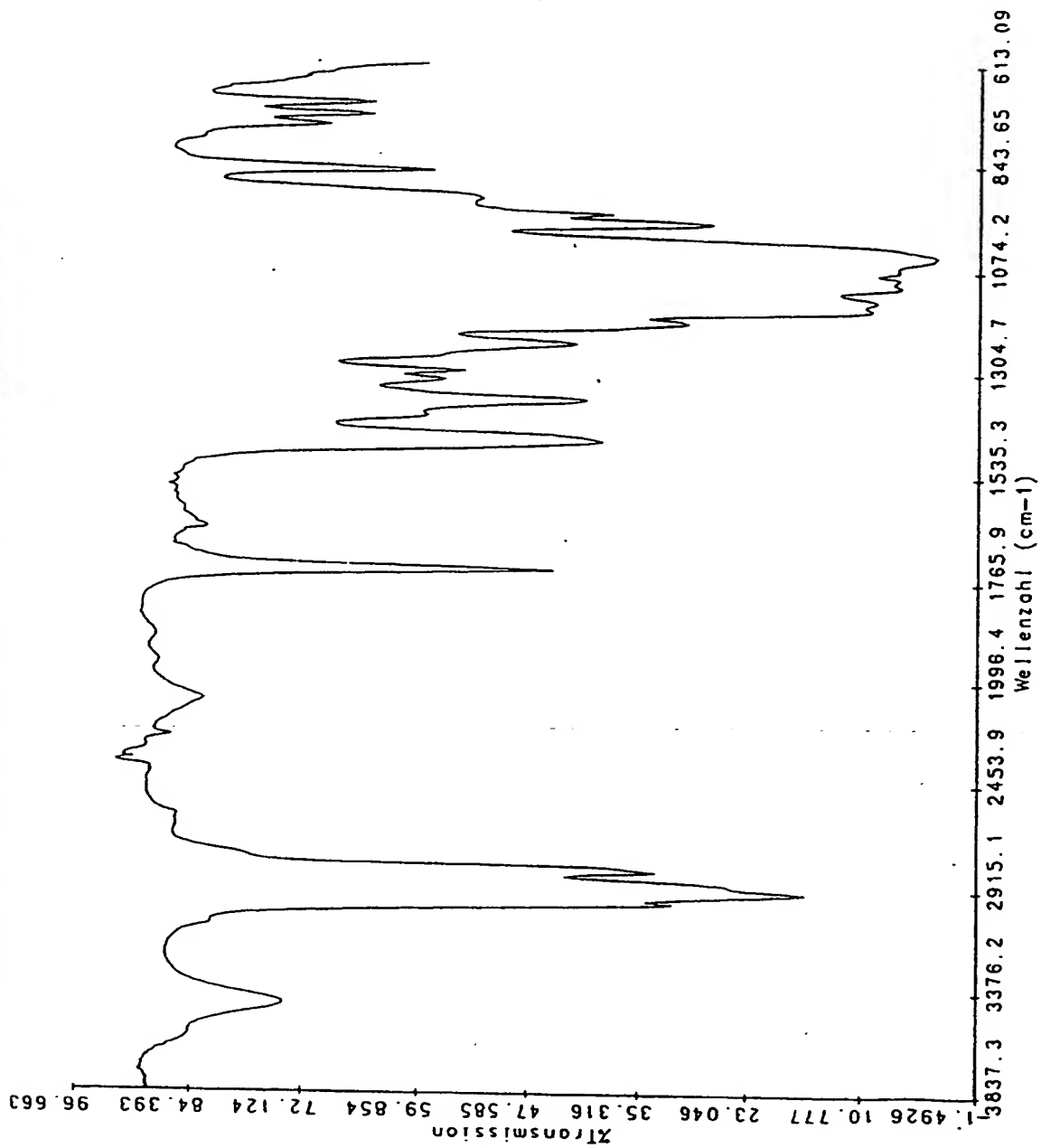


FIG. 1



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 94 10 0332

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
X	WO-A-89 01931 (THE UNIVESITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) * Seite 5, Zeile 29 - Seite 6, Zeile 20 * ---	1-3,8	B01J20/32 B01D15/08
A	EP-A-0 180 563 (EXPLOATERINGS AB) * Seite 11; Ansprüche 1-6 * ---	1,3	
A	EP-A-0 234 129 (J.T.BAKER CHEMICAL) * Seite 6, Zeile 17-40 * * Seite 3, Zeile 14-19 * ---	5,7	
A	EP-A-0 373 391 (CEKOSLOVENSKA AKADEMIE VED) * Seite 4; Ansprüche 1-12 * ---	1,2	
P,A	US-A-5 268 442 (BRADSHAW) 7. Dezember 1993 * Spalte 8, Zeile 30 - Spalte 9, Zeile 35 * * Spalte 28, Zeile 63-68 * -----	1,2,8	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5)
			B01J B01D
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchesort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 29. April 1994	Prüfer Wendling, J-P
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

THIS PAGE BLANK (USPTO)